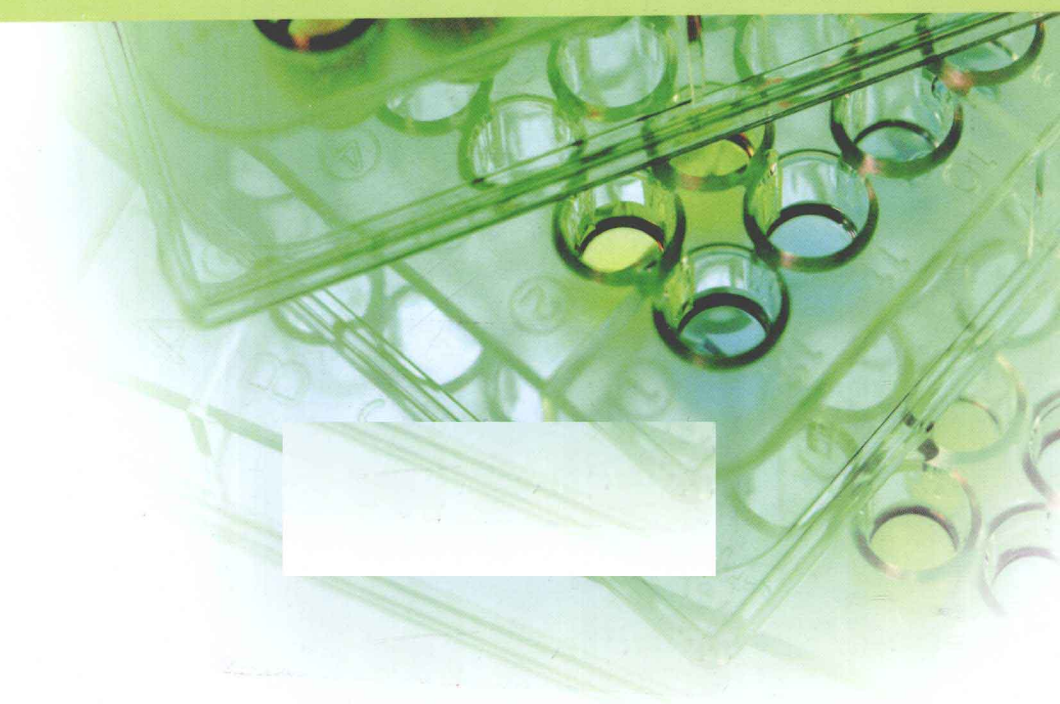


高等医学院校实验教程

医学免疫学 实验教程

主编 张晓莉 新燕 张涛



北京大学医学出版社

第2版 医学免疫学实验教材

医学免疫学

实验教材

主编 李树刚 副主编 李树刚



人民卫生出版社

高等医学院校实验教程

医学免疫学实验教程

主 编 张晓莉 新 燕 张 涛

副主编 官 杰 吕跃山

编 委 (按姓氏拼音排序)

官 杰 (齐齐哈尔医学院)	吕跃山 (哈尔滨医科大学大庆校区)
钱丽丽 (齐齐哈尔医学院)	沈敬华 (内蒙古医学院)
唐小云 (牡丹江医学院)	王建杰 (佳木斯大学)
王 琪 (齐齐哈尔医学院)	新 燕 (内蒙古医学院)
闫冬梅 (佳木斯大学)	张红军 (牡丹江医学院)
张 涛 (佳木斯大学)	张晓莉 (牡丹江医学院)

北京大学医学出版社

YIXUE MIANYIXUE SHIYAN JIAOCHENG

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学实验教程/张晓莉, 新燕, 张涛主编.

—北京: 北京大学医学出版社, 2010. 8

ISBN 978-7-81116-957-7

I. ①医… II. ①张…②新…③张… III. ①医药学:
免疫学—实验—医学院校—教材 IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 125562 号

医学免疫学实验教程

主 编: 张晓莉 新 燕 张 涛

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumppress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京瑞达方舟印务有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 韩忠刚 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 9.5 字数: 238 千字

版 次: 2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 次印刷 印数: 1 - 8000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-957-7

定 价: 16.50 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

高等医学院校实验教程编审委员会

主任委员 程伯基

副主任委员 (按姓氏拼音排序)

崔光成 关利新 乔远东 魏晓东 毅 和

委 员 (按姓氏拼音排序)

卜晓波 陈志伟 李艳君 梁 军 林雪松

刘 星 刘伯阳 刘东璞 刘文忠 马淑霞

马小茹 欧 芹 沈晓玲 宋印利 孙宏丽

田国忠 新 燕 云长海 张 涛 张晓莉

张振涛 朱金玲

前 言

免疫学是基础医学的重要学科，是现代生命科学的前沿学科之一，近年来发展迅猛，与其他基础及临床学科的交叉渗透越来越广泛和深入，尤其是现代免疫学技术已经渗透到生命科学研究的每一个领域，不论是基础研究领域，还是临床医学诊断和研究，都离不开免疫学技术。因此医学生在免疫学学习过程中，掌握一定的实验技能，既可巩固理论知识又可为今后的研究和实践奠定扎实的基础。

在医学免疫学教学环节中实验教学具有与理论教学同等重要的作用，实验教学工作不仅仅是培养学生的操作技能，还应该侧重于学生分析问题、解决问题及创新能力的培养。因此为适应我国高等医学教育改革和发展的需要，本着全面贯彻落实科学发展观、培养符合时代要求的医学人才的宗旨，我们五所院校在教学一线工作、具有丰富教学经验的教师，针对免疫学的特点、教学过程中发现的问题对免疫学实验技术进行了认真细致的甄选，编写了这本实验教程。

内容上我们摒弃了一些陈旧的、重复性的实验内容，新增了一些与现代分子医学相关的新技术。在篇章结构上进行了优化和调整，力求实验内容系统和完整。全书共设五章，经典免疫学实验技术分列四章，主要是：抗原抗体反应、免疫细胞检测、免疫分子检测、临床免疫（超敏反应）。第五章其他免疫学技术主要介绍了综合实验和科研工作中常用的免疫学实验方法。附录主要介绍基本实验技能：动物饲养、抓持、采血、处死方法；常用试剂的配制等。本书力求简明实用，使其适合各专业层次的教学实践需要，同时也能为医学本科生提供一些基本的科研实验方法。

由于编写时间仓促、我们的水平有限，书中难免会有疏漏和错误，真诚希望广大师生指正，并提出宝贵意见。

张晓莉

2010年5月13日

目 录

第一章 经典抗原抗体反应	1
第一节 凝集反应	2
实验一 直接凝集试验	2
实验二 间接凝集试验	6
第二节 沉淀反应	10
实验一 环状沉淀试验	11
实验二 琼脂扩散试验——单向免疫扩散	12
实验三 琼脂扩散试验——双向免疫扩散	14
实验四 免疫电泳技术	16
第三节 补体参与的抗原抗体反应——补体结合试验	20
第四节 免疫标记技术	24
实验一 酶免疫技术	25
实验二 免疫荧光技术	30
第二章 免疫细胞及其功能检测	33
第一节 免疫细胞分离	33
实验一 人外周血细胞分离	33
实验二 淋巴组织中淋巴细胞的分离	40
实验三 淋巴细胞的分离、纯化	42
第二节 淋巴细胞免疫功能检测	52
实验一 T淋巴细胞亚群的检测	52
实验二 T淋巴细胞功能检测	56
实验三 B淋巴细胞及其功能检测	64
第三节 非特异免疫细胞功能检测	70
实验一 中性粒细胞吞噬功能测定(小吞噬试验)	70
实验二 中性粒细胞活性检测	71
实验三 中性粒细胞趋化功能测定	72
实验四 动物腹腔巨噬细胞收集	72
实验五 巨噬细胞吞噬功能测定	73
实验六 NK细胞活性测定	75
第三章 免疫分子检测技术	79
第一节 血清补体活性测定及相关实验	79
实验一 总补体活性测定(CH_{50} 测定)	79
实验二 补体 C3、C4 含量测定	80
第二节 细胞因子的检测	82
实验一 白细胞介素-2(IL-2)生物学活性测定	82

实验二 血清可溶性白细胞介素-2受体(sIL-2R)水平的检测	83
实验三 IL-1生物学活性检测——小鼠胸腺细胞增殖法	84
实验四 IL-8生物学活性检测	85
第四章 超敏反应	87
实验一 I型超敏反应	87
实验二 IV型超敏反应	92
第五章 免疫学相关实验技术	94
第一节 抗体的制备及鉴定	94
实验一 多克隆抗体制备	94
实验二 单克隆抗体制备	97
第二节 免疫组织(细胞)化学技术	103
第三节 免疫印迹	109
第四节 流式细胞术	114
第五节 细胞凋亡检测	117
第六节 HLA分型	120
附录一 常用医学免疫学仪器及使用方法	122
附录二 常用医学免疫学试剂的配制	125
附录三 其他	138

第一章 经典抗原抗体反应

抗原和相应抗体，无论在体内或体外相遇，均可发生各种各样的反应，统称为抗原抗体反应。抗原抗体反应可发生于体内，也可发生于体外。在体内主要表现为体液免疫应答，可介导吞噬、溶菌、杀菌、中和毒素等作用。体外反应则根据抗原的物理性状、抗体的类型及参与反应的介质不同，可出现凝集反应、沉淀反应、补体参与的反应及中和反应等各种不同的反应类型。在体外进行的抗原抗体反应，因抗体多采用血清，所以也称为血清学反应（serologic reaction）。由于抗原抗体具有严格的特异性和较高的敏感性，因此可采用已知抗原或抗体中的任何一方去检测未知的另一方，用于传染病的辅助诊断、微生物的鉴定和化学分析测定等。

一、抗原抗体反应的规律和特点

1. 特异性

所谓特异性，即一种抗原只能和由它刺激产生的抗体相结合，不能跟与它无关的抗体发生反应。这种特性是由抗原的决定簇基与抗体的化学组成、空间立体构型所决定的。例如白喉抗毒素只能与相应的外毒素相结合，而不能与破伤风外毒素结合。但由于较大分子的蛋白质常含有多种抗原表位。如果两种不同的抗原分子上有相同的抗原表位，或抗原、抗体间构型部分相同，都可出现交叉反应。

2. 按比性

抗原一般都是多价的，而抗体（IgG）则是二价的，只有二者比例适合时，抗原抗体才能结合得最充分，形成的抗原抗体复合物最多，反应最明显，结果出现最快，此称为等价带。如抗原或抗体过多，则二者结合后均不能形成大的复合物，不呈现可见反应，称此为带现象。在抗体过量时，称为前带；在抗原过剩时，称为后带。

3. 可逆性

抗原与抗体的结合虽具有稳定性，但由于二者之间是非共价键结合，因此又是可逆的，在一定条件下可解离，且解离后各自生物活性不变。抗原抗体复合物的解离取决于两方面的因素，一是抗体对相应抗原的亲和力，二是环境因素对复合物的影响。高亲和性抗体的抗原结合点与抗原表位在空间构型上非常适合，两者结合牢固，不容易解离；反之，则较易解离。解离后的抗原或抗体均能保持未结合前的结构、活性及特异性。

4. 分阶段反应

抗原抗体反应可分为两个阶段：第一为抗原与抗体发生特异性结合的阶段，此阶段反应快，仅需几秒至几分钟，但不出现可见反应。第二为可见反应阶段，抗原抗体复合物在环境因素（如电解质、pH、温度、补体）的影响下，进一步交联和聚集，表现为凝集、沉淀、溶解、补体结合介导的生物现象等肉眼可见的反应。此阶段反应慢，往往需要数分钟至数小时。实际上这两个阶段难以严格区分，而且两阶段的反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响，若反应开始时抗原抗体浓度较大且两者比较适合，则很快能形成可见反应。

5. 敏感性

抗原抗体不仅有高度特异性，还具有较高敏感性，不仅可用于定性，还可用于检测极微

量的抗原、抗体，其灵敏程度大大超过当前应用的常规化学方法。不过视反应的类型不同，其敏感性有很大的差异。

二、影响抗原抗体反应的因素

1. 电解质

电解质能降低抗原抗体结合物的表面电荷，从而促使其沉淀或凝聚。最常用的是 NaCl，适宜浓度为 0.15mol/L。

2. pH

大多数抗原抗体反应的最适 pH 为 6~8。当反应 pH 接近蛋白质的等电点 (pH5~5.5) 时，往往导致抗原抗体的非特异性沉淀。pH 为 2~3 时可使抗原抗体结合物解离。

3. 温度

反应温度与反应速度有密切关系。温度高时反应速度快，这是由于温度高使分子运动加速，从而使参加反应的分子或颗粒之间增加碰撞所致。沉淀反应在低温中进行时，反应速度虽减慢，但结合完全，因而沉淀物增多。补体结合反应亦在低温时结合较为敏感。反应的最适温度通常为 37℃。

4. 振荡

机械振荡能加速反应，但强烈的振荡可使结合物解离。

5. 杂质

反应中如存在与反应无关的蛋白质、多糖等非特异性的结合物质，往往抑制反应进行，甚至引起非特异性反应。

(张晓莉)

第一节 凝集反应

颗粒性抗原 (如细菌、红细胞) 与相应的抗体相结合，在一定的条件下可出现肉眼可见的凝集团块，此为凝集反应，即直接凝集反应。若将可溶性抗原制备成颗粒性抗原与其相应的抗体结合则为间接凝集反应。

实验一 直接凝集试验

细菌或红细胞抗原 (颗粒性抗原) 与相应抗体在适当条件下发生反应，出现肉眼可见的凝集团块，称为直接凝集反应。直接凝集技术在操作方法上有玻片法和试管法两种。

一、玻片凝集试验

【实验目的】

掌握玻片法凝集试验原理及临床意义；熟悉其操作方法和注意事项。

【实验原理】

玻片凝集试验是将已知的抗体直接与未知的颗粒性抗原物质 (如细菌、立克次体、钩端螺旋体等) 混合，在有适当电解质存在的条件下，如两者对应便发生特异性结合而形成肉眼可见的凝集物，即为阳性；如两者不对应便无凝集物出现，即为阴性。此法属定性试验，主要用于检测抗原，如 ABO 血型鉴定、细菌鉴定和分型等。

(一) 未知菌种鉴定

【实验原理】

将已知的抗体直接与待检细菌混合，在有适当电解质存在的条件下，如两者对应便发生特异性结合而形成肉眼可见的凝集物。

【实验材料】

1. 标本 任一常见细菌的平板或斜面培养物。
2. 试剂 与细菌对应的诊断血清（用于细菌鉴定的诊断血清效价应在 1 : 1600 以上，使用时用生理盐水 1 : 20 稀释，以免发生前带现象）；生理盐水等。
3. 器材 载玻片、接种环、酒精灯等。

【实验方法】

1. 于洁净载玻片的一端加诊断血清一滴（约 25 μ l），另一端加生理盐水一滴（约 25 μ l）作对照。
2. 用接种环取待检细菌琼脂斜面培养物或细菌悬液适量，分别与生理盐水和诊断血清研磨混匀。
3. 轻轻转动载玻片，静置 5min，观察结果。

【实验观察】

生理盐水对照应不发生凝集，为均匀混浊的乳状液。在诊断血清中，如细菌抗原凝集成小块、周围液体澄清为阳性反应，说明抗原抗体相对应；如与对照相同，为阴性。

【注意事项】

1. 每一待检菌均需做生理盐水对照，当细菌发生（S-R）变异时，可发生自凝。如对照发生凝集，试验结果无效。
2. 在载玻片两端涂布细菌时，注意一定要先在生理盐水中涂，后在诊断血清中涂，以免将血清误带入盐水中。
3. 判定结果时，必须防止干燥。混匀面积不要摊开过大。
4. 试验后的细菌仍有传染性，应将载玻片放入消毒缸内。
5. 有些细菌表面常有一层表面抗原，如伤寒沙门菌的 Vi 抗原及志贺菌属的 K 抗原，能阻止菌体抗原与诊断血清的凝集，而导致错误的判定。此时，应将细菌悬液煮沸 1h，以破坏其表面抗原，然后再做试验。

(二) ABO 血型测定

【实验原理】

人类 ABO 血型抗原有 A 和 B 两种。A 型红细胞膜上有 A 抗原，B 型红细胞膜上有 B 抗原，AB 型有 A 和 B 两种抗原，而 O 型则不含有 A 和 B 抗原。据此，如分别将抗 A 和抗 B 血清与待测红细胞混合，抗 A 和/或抗 B 血清与红细胞表面上的相应抗原结合而引起红细胞凝集，根据其凝集状况便可判定受试者的血型（表 1-1）。

【实验材料】

1. 标准抗 A 和抗 B 血清。
2. 生理盐水、小试管、毛细吸管、牙签、凹玻片、采血针、酒精棉球等。

【实验方法】

1. 用酒精棉球消毒无名指指端皮肤或耳垂，待酒精干后用无菌采血针刺破表皮，用毛细吸管取血 1~2 滴，放入含 1ml 生理盐水的小试管中，混匀，即成待检红细胞悬液（浓度

约为 5%)。取血后，应立即用无菌干棉球压迫针眼止血。

2. 取凹玻片或载玻片一张，用记号笔分为两格，并注明 A、B 字样。

3. 用吸管吸取抗 A 血清、抗 B 血清各一滴分别滴于 A、B 格内。

4. 另用吸管取待测红细胞悬液，于 A 格和 B 格内各加一滴。然后分别用牙签将抗血清与红细胞搅拌均匀（也可轻轻晃动载玻片以促其充分混匀），以加速其反应。将载玻片放置于实验台上静置数分钟后，在白色背景下观察凝集情况。

【实验观察】

如混合液由均匀红色混浊状逐渐变为澄清，并出现大小不等的红色凝集团块者即为红细胞凝集；若混合液仍呈均匀混浊状，则表明红细胞未发生凝集。如肉眼观察不够清楚，可将载玻片置于显微镜下用低倍镜观察。

表 1-1 血型鉴定试验结果与判定

血型 \ 诊断血清	抗 A	抗 B
A	+	-
B	-	+
AB	+	+
O	-	-

“+”表示凝集，“-”表示无凝集。

【注意事项】

1. 实验用凹玻片或载玻片要清洁，注明 A 和 B 字样。
2. 所用抗 A、抗 B 血清必须在有效期内（注意试剂包装说明的有效期限）使用。
3. 待检红细胞悬液不宜过稀或过浓。
4. 要及时观察结果，以防时间过长使标本干涸而影响结果观察和判定。

【思考题】

1. 简述玻片凝集的实验原理及临床意义。
2. 玻片法检测菌种和血型需要注意哪些事项？

二、试管凝集试验

【实验目的】

掌握试管法凝集试验的原理及临床意义；熟悉其操作方法和注意事项。

【实验原理】

试管法是用定量抗原悬液与一系列倍比稀释的待检血清混合，静置后，根据每管内颗粒抗原凝集的程度，以判定待检血清中有无相应抗体及其效价。本实验在临床检验中主要有诊断伤寒和副伤寒病的肥达（Widal）试验，诊断斑疹伤寒、恙虫病、立克次体病的外斐（Weil Felix）试验，诊断传染性单核细胞增多症的嗜异性凝集试验等。

【实验材料】

- 1. 标本 待检血清（用生理盐水 1：10 稀释）。
- 2. 试剂 伤寒沙门菌 H 或 O 诊断菌液（ 7×10^8 /ml）、生理盐水。
- 3. 器材 恒温箱、试管架、试管、吸管等。

【实验方法】

- 1. 取洁净小试管 8 支列于试管架上，依次编号，每管内加入 0.5ml 生理盐水。
- 2. 吸取 1：10 稀释的待检血清 0.5ml 加入第 1 管，充分混匀后，吸出 0.5ml 加入第 2 管，同法混匀后，再吸出 0.5ml 加入第 3 管。依此类推，连续稀释到第 7 管。最后，从第 7 管吸出 0.5ml 弃去。第 8 管不加血清，为生理盐水对照管。这样从第 1 管至第 7 管血清的初始稀释度为 1：20，1：40，1：80，1：160，1：320，1：640，1：1280。这种稀释方法称为连续倍比稀释法，是免疫学实验中最常用的一种稀释法。
- 3. 每管加诊断菌液 0.5ml，此时每管内的血清稀释度又增加 1 倍，分别为 1：40，1：80，1：160，1：320，1：640，1：1280，1：2560。
- 4. 各管摇匀后，置室温或 37℃ 24h 后，观察结果。操作程序见表 1-2。

表 1-2 试管凝集试验操作程序（单位：ml）

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
生理盐水	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1：10 血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃去 0.5
诊断菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释度	1：40	1：80	1：160	1：320	1：640	1：1280	1：2560	对照

室 温 或 37℃，24h

【结果判断】

- 判断凝集试验的结果，要有良好的光源和黑暗的背景，先不振摇，观察管底凝集物和上清的浊度。然后轻轻摇动试管，注意观察凝集颗粒的松软度、大小、均匀度等性状及液体的混浊程度。
- 1. 盐水对照管应无凝集现象，轻轻摇动试管，细菌分散均匀混浊。
 - 2. 伤寒沙门菌“O”抗原凝集物呈颗粒状沉于管底，轻摇时不易散开；“H”抗原凝集物呈絮状，疏松而大块地沉于管底，轻摇易离散。根据凝集的强弱程度，可将实验结果分为 5 级。
 - “4+” 很强，细菌全部凝集，凝块全沉于管底，液体澄清。
 - “3+” 强，细菌大部分凝集，液体稍混浊。
 - “2+” 中等强度，细菌部分凝集，液体较混浊。
 - “+” 弱，仅少量细菌凝集，液体混浊。
 - “-” 不凝集，液体混浊度与对照管相同。
 - 3. 血清抗体效价 以出现“2+”凝集反应的最大血清稀释度作为待检血清中的抗体

效价。

4. 根据凝集效价的判定方法报告待检血清对伤寒沙门菌 O 抗原 (TO) 或伤寒沙门菌 H 抗原 (TH) 的凝集效价。如果第 1 管仍无凝集现象, 应报 “ $<1:40$ ”; 第 7 管仍显 “2+” 或更强凝集, 应报 “ $>1:2560$ ”。

【注意事项】

1. 试管凝集试验只有在抗原抗体比例适当时才能出现肉眼可见的反应。一般情况下, 随着血清浓度的逐渐稀释, 凝集反应越来越弱。但在抗体浓度过高时, 反无凝集现象出现, 此为前带现象。出现该情况时, 须加大抗体稀释度重新试验。

2. 判定结果时, 应在暗背景下透过强光检查。

3. 注意温度、电解质、振摇对试验结果的影响。抗原抗体加入后, 要充分混匀, 以增加抗原抗体的接触。

【思考题】

1. 简述试管凝集的实验原理及临床应用。
2. 试管凝集试验有哪些注意事项?

(吕跃山)

实验二 间接凝集试验

将可溶性抗原吸附于一种与免疫无关、大小均匀的载体微粒表面, 再与相应抗体在适宜条件下相互作用, 可由于抗原抗体反应而使颗粒被动地凝集, 出现肉眼可见的凝集现象, 这种方法称间接凝集试验。如将抗体吸附于颗粒表面用以检测抗原, 则称为反相间接凝集试验, 试验方法和原理与前者相同。实验室常用的载体有红细胞、胶乳颗粒、活性炭、SPA 菌体等。

一、间接凝集试验

(一) 类风湿因子测定

类风湿因子 (RF) 是抗人或动物 IgG Fc 段的抗体, 是以变性 IgG 为靶抗原的自身抗体。IgM 型 RF 被认为是 RF 的主要类型, 也是临床免疫检验中常规方法所测定的类型。

【实验原理】

IgG 吸附于聚苯乙烯胶乳颗粒上作为检测试剂, 在反应介质中, 待检血清中如含有 RF, 可与胶乳颗粒出现凝集反应。

【实验材料】

1. 人 IgG 致敏胶乳试剂 类风湿因子检测试剂, 有商品出售。
2. 类风湿因子阳性和阴性血清 类风湿因子检测商品试剂有配套的阳性和阴性对照, 也可从临床筛选获得。
3. 生理盐水、黑色方格反应板、牙签、吸管等。

【实验方法】

1. 将待检血清、阳性血清、阴性血清分别用生理盐水 $1:20$ 倍稀释 (类风湿因子检测商品试剂配套的阳性和阴性对照不必稀释), 备用。
2. 在黑色方格反应板上取三格, 用吸管分别加稀释的待检血清、阳性血清、阴性血清

各 1 滴，然后每格加入人 IgG 致敏胶乳试剂 1 滴，充分混匀。

【实验观察】

在反应板上充分混匀后，连续摇动 2~3min 后与对照比较，观察结果。胶乳颗粒出现均匀凝集者为阳性反应，无凝集者为阴性。

【注意事项】

1. 试剂应保存在 4℃，切勿冻存，使用前应使试剂接近室温并摇匀。
2. 日光灯光线不利于结果观察，观察时应排除非特异性凝集的可能性。

（二）抗链球菌溶血素“O”抗体的测定

链球菌溶血素“O”（SLO），主要是 A 族乙型溶血链球菌所产生的一种代谢产物。人体在感染该型链球菌后，血清中可出现大量抗链球菌溶血素“O”（ASO）抗体。测定此抗体效价，可作为风湿热、急性肾小球肾炎等与链球菌感染有关疾病的辅助诊断。测定抗链球菌溶血素“O”抗体的试验简称抗“O”试验。

【实验原理】

当被检血清中有高滴度的抗链球菌溶血素“O”（ASO）抗体时，用适量链球菌溶血素“O”（SLO）中和掉正常水平后仍有多余 ASO 抗体存在，这些多余的抗体与交联有溶血素“O”的胶乳试剂（ASO 胶乳试剂）反应时，可以出现明显的凝集颗粒。

【实验材料】

待检血清标本，溶血素“O”溶液、ASO 胶乳试剂、阳性血清、阴性血清、黑色方格反应板、试管、吸管、牙签等。

【实验方法】

1. 将阳性血清、阴性血清、1:15 稀释的待检血清各 1 滴分别滴在黑色方格反应板上。
2. 然后各滴加溶血素“O”溶液 1 滴，轻轻摇动 1min，使其充分混匀。
3. 再滴加 ASO 胶乳试剂 1 滴，轻轻摇动 3~5min，观察结果。

【实验结果】

有清晰凝集者为阳性；不出现清晰凝集者为阴性。若待检血清（1:15）为阳性时，应进一步将其稀释为 1:30 和 1:60，再重复试验，出现凝集的血清稀释度与 ASO 抗体滴度间的关系大致如下。

稀释度	ASO (U/ml)
1:15	400
1:30	800
1:60	1600

【注意事项】

1. ASO 胶乳试剂加入后，轻轻摇动到指定时间时应立即记录结果，超过规定时间后再出现凝集不判定为阳性。
2. 室温降低 10℃，反应时间延长 1min，室温升高 10℃，反应时间缩短 1min。

【思考题】

1. 简述间接凝集试验的原理。
2. 什么是 RF 和 ASO?
3. 简述检测 RF 和抗“O”试验的注意事项。

二、间接凝集抑制试验

【实验目的】

掌握胶乳凝集抑制试验的原理及临床意义；熟悉其操作方法及注意事项。

【实验原理】

间接凝集抑制试验是利用已知抗原致敏的颗粒与待测标本中可溶性抗原（包括半抗原）竞争有限抗体的经典血清学方法。先在特异性抗体中加入标本，再加入抗原致敏的载体颗粒，若标本中含有相应抗原，则与抗体结合，阻断了载体颗粒表面的抗原与抗体的结合，故不出现凝集现象，为阳性结果。本试验以检测绒毛膜促性腺激素（HCG）的免疫妊娠试验为例。

【实验材料】

1. 标本 孕妇尿（阳性对照）、正常尿（阴性对照）、待检尿。
2. 试剂 人绒毛膜促性腺激素（HCG）致敏的乳胶颗粒、抗人 HCG 和生理盐水等。
3. 器材 反应板或载玻片、滴管、牙签等。

【实验方法】

1. 所有试剂使用前均先放室温下预温。
2. 选择一块洁净载玻片，平均分成四个格；并分别把阳性对照、阴性对照、盐水及待检标本做好标记。
3. 吸取待检尿标本 1 滴（约 $50\mu\text{l}$ ）置于载玻片的第一格，随后分别在其他格各加 1 滴（约 $50\mu\text{l}$ ）生理盐水、阴性和阳性对照。
4. 在载玻片上的四个格内均加抗人 HCG 1 滴（约 $50\mu\text{l}$ ），分别用牙签混匀，在实验台上缓缓摇动 1min。
5. 再各滴加入 HCG 致敏胶乳 1 滴（约 $50\mu\text{l}$ ），混匀，连续缓慢摇动 2~3min，在较强光线下观察结果。

【实验观察】

1. 生理盐水与阴性对照应出现明显凝集颗粒，而阳性对照应呈均匀乳状，否则可视为试剂有问题或操作有误。
2. 待测尿标本若呈现凝集为 HCG 阴性，如仍呈乳白色、均匀、非凝集状，则为 HCG 阳性。

【注意事项】

1. 待测尿液以晨尿为好，此时 HCG 含量最高，若不及时检测应将标本置冰箱冷藏。冷藏超过 24h 则应置 -20°C 冻存。在使用前先经 37°C 水浴并充分混匀。标本中若含血细胞或较多蛋白和细菌污染则不宜使用。
2. 所用试剂均应保存于 4°C ，切勿冻存，使用前应摇匀。
3. 做凝集抑制试验时应注意标本及各诊断试剂加入的先后次序，还必须设立阳性和阴性对照。
4. 结果观察时可置黑色背景下，亦可倾斜反应板或载玻片于液体流动时观察。若出现非均匀漂浮状白色颗粒，可能系非特异性凝集，此时应将尿液离心后取上清重复试验或重新留尿液检测。

【思考题】

1. 何谓间接凝集抑制试验?
2. 如何判定免疫妊娠试验的实验结果, 应注意哪些事项?

三、协同凝集试验**【实验目的】**

掌握协同凝集试验的原理及注意事项; 熟悉其操作方法。

【实验原理】

协同凝集试验是一种特殊类型的间接凝集技术。它是利用金黄色葡萄球菌细胞壁成分中的 A 蛋白 (SPA) 为媒介进行的抗原抗体反应。SPA 可与人和多种哺乳动物 (如猪、兔、豚鼠等) 血清中的 IgG 类抗体的 Fc 段结合而不影响其 Fab 段功能。用表达 SPA 的金黄色葡萄球菌吸附某种特异性 IgG 制成致敏载体颗粒, 可与相应的抗原结合, 导致细菌凝集。该试验可用于许多可溶性抗原的测定。本试验以制备的伤寒沙门菌可溶性 “O” 抗原溶液代替临床标本检测为例。

【实验材料】

1. 标本 伤寒沙门菌可溶性 “O” 抗原溶液的制备:

将伤寒沙门菌 “O” 901 接种于普通琼脂斜面培养基, 置 37℃ 培养 18~24h, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 配成 100 亿/ml 菌悬液, 置 100℃ 水浴 2h, 3500r/min, 离心 30min。吸取上清液, 分装在无菌三角烧瓶中, 置 4℃ 冰箱备用。

2. 试剂

(1) 协同标准菌株: 金黄色葡萄球菌 Cowan I 株 (NCTC—8530, 卫生部药品生物制品检定所编号 2611)

- (2) 普通肉汤培养基、普通平板。

(3) 0.5% 福尔马林、pH7.4 0.01mol/L PBS、0.01mol/L pH7.1~7.4PBS、生理盐水。

- (4) 伤寒沙门菌 “O” 抗原免疫血清 (免疫血清预先放 56℃ 水浴加热 30min)。

3. 器材 离心机、恒温箱、培养箱、酒精灯、接种环、载玻片、无菌滴管、吸管及试管等。

【实验方法】

1. SPA 菌稳定液的制备

(1) 取 Cowan I 菌株接种在肉汤培养基内, 置 37℃ 培养 18~24h, 再转种于普通平板, 37℃ 培养 18~24h。

(2) 用适量 0.01mol/L pH7.1~7.4PBS 洗下菌苔, 以 3000r/min 离心 15min, 洗涤三次, 然后用 0.5% 福尔马林-pH7.4 0.01mol/L PBS 稀释成 1×10^9 /ml 细菌悬液 (或 10% 菌悬液), 分装保存备用。

2. SPA 菌诊断液的制备

(1) 取上述 SPA 菌稳定液 1ml, 加已知灭活的伤寒沙门菌免疫血清 0.1ml, 充分混匀。

(2) 置 37℃ 恒温箱 30min, 每隔 10min 振荡一次, 然后以 3000r/min 离心 15min, 弃上清液, 并用 PBS 洗涤两次, 最后沉淀加 PBS 至 10ml, 混匀备用。

3. 将载玻片分成 3 格, 编号为 1、2、3, 于第 1、2 格分别加 1 滴 (约 50 μ l) SPA 菌诊